Simplexa™ Flu A/B & RSV

REF MOL2600
Rev. D

Echtzeit-RT-PCR-Test zum qualitativen Nachweis und zur Differenzierung viraler RNA von Influenza A, Influenza B & RSV *in vitro*

In-vitro-Diagnostikum

ANWENDUNGSBEREICH

Der SimplexaTM Flu A/B & RSV-Assay von Focus Diagnostics ist für die Anwendung auf dem Integrated Cycler von 3M für den qualitativen Nachweis und die Differenzierung von RNA zwischen dem Influenza A-, dem Influenza B- und dem Respiratory-Syncytial-Virus (RSV) *in vitro* in Nasenrachenabstrichen (NPS) aus menschlichen Patienten mit Anzeichen und Symptomen einer viralen Atemwegsinfektion in Verbindung mit dem Vorliegen klinischer und epidemiologischer Risikofaktoren bestimmt. Der Test ist als Hilfsmittel zur Differentialdiagnose bei Infektionen mit dem Influenza A-, dem Influenza B- und dem RS-Virus beim Menschen und nicht zur Erkennung einer Infektion mit dem Influenza-C-Virus bestimmt.

Negative Ergebnisse schließen eine Infektion mit Influenza- oder RS-Virus nicht aus und dürfen nicht als alleinige Grundlage für die Behandlung oder andere Entscheidungen bezüglich der Versorgung des Patienten herangezogen werden.

Die Leistungscharakteristika für Influenza A wurden während der Grippesaison 2010 als H1N1-Influenza 2009 das vorherrschende Influenza A Virus war. Wenn andere Influenza-A-Viren auftreten, können sich die Leistungscharakteristika ändern.

Wenn basierend auf den von den Gesundheitsbehörden empfohlenen aktuellen klinischen und epidemiologischen Screening-Kriterien eine Infektion mit einem neuartigen Influenza-A-Virus vermutet wird, sollten unter, für neuartige virulente Influenza-Viren geeigneten Infektionsschutzmaßnahmen Proben entnommen werden und an die lokalen oder nationalen Gesundheitsbehörden zur Untersuchung eingeschickt werden. Falls keine BSL 3+ Einrichtung zur Verfügung steht, die die Proben verarbeitet und kultiviert, dürfen in diesen Fällen keine Viruskulturen angelegt werden.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Influenza wird von drei immunologischen Typen (A, B und C) von RNA-Viren aus der Familie der Orthomyxoviridae verursacht. Die weitere Klassifizierung von Influenza A stützt sich auf die Beschreibung von zwei auf der Virusoberfläche exprimierten Virusproteinen, Hämagglutinin und Neuraminidase. Hämagglutinin ermöglicht die Bindung des Virus an die Epithelzellen der Atemwege, während Neuraminidase diese Bindungen an die Wirtszelle löst, sodass neue Virionen freigesetzt werden können. Saisonale Influenza wird üblicherweise durch Viren verursacht, die einen der drei häufigsten Hämagglutininsubtypen (H1, H2 oder H3) und zwei Neuraminidasesubtypen (N1 oder N2) enthalten. Influenza B wird nicht in Subtypen klassifiziert.

Influenza äußert sich in der Regel in einer Kombination von Anzeichen und Symptomen der oberen und unteren Atemwege sowie Fieber, Kopfschmerzen, Muskelschmerzen und allgemeinem Unwohlsein. Das Krankheitsbild kann unterschiedlich ausfallen; das Spektrum reicht von isolierten, erkältungsähnlichen Atemwegsbeschwerden bis hin zu schwerer Lungenentzündung, die stationär behandelt werden muss. Personen, bei denen ein höheres Risiko für stationäre Behandlungen besteht, sind Kinder unter 2 Jahren, Erwachsene jenseits des 65. Lebensjahres und Patienten mit signifikanten Begleitkrankheiten. Eine Grippe kann zu einer Verschlechterung von medizinischen Basiserkrankungen führen. Die Dauer der Krankheit beträgt in der Regel 2–5 Tage, jedoch können die Symptome auch eine Woche oder länger anhalten.

Eine Infektion mit dem Respiratory-Syncytial-Virus (RSV) ist bei Säuglingen und Kleinkindern prävalenter, kommt aber auch bei Erwachsenen vor, insbesondere in Seniorenheimen oder bei Patienten mit beeinträchtigtem Immunsystem.[1] RSV verursacht verschiedene Atemwegssymptome. Bei Säuglingen und kleinen Kindern kann RSV erkältungsartige Symptome, Bronchitis, Krupphusten und/oder Infektionen der unteren Atemwege wie Bronchiolitis und Pneumonie hervorrufen. Eine symptomatische Infektion bei Erwachsenen geht in der Regel mit einer Infektion der oberen Atemwege einher und kann sich durch eine laufende Nase (Rhinorrhö), Halsschmerzen (Pharyngitis), Husten, Kopfschmerzen, Abgeschlagenheit und Fieber äußern. Bei manchen Hochrisikopersonen, beispielsweise solchen mit bestimmten chronischen Krankheiten oder unter Immunsuppression, können allerdings stärkere Symptome auftreten, die mit einer Infektion der unteren Atemwege wie Pneumonie einhergehen.[1]

GRUNDLAGEN DES VERFAHRENS

Bei dem Test handelt es sich um ein Echtzeit-RT-PCR-System zur Amplifikation und Detektion. Es verwendet eine bifunktionelle fluoreszierende Primersonde für die Erkennung von RNA des menschlichen Influenza A-Virus, von RNA des menschlichen

Influenza-B-Virus und von RNA des Respiratory-Syncytial-Virus in Nasenrachenabstrichen (NPS). Der Test besteht im Wesentlichen aus zwei Schritten: (1) Extraktion von RNA aus Patientenproben, (2) Amplifizierung eines spezifischen Zielmoleküls (in jedem Analyt und in der internen RNA-Kontrolle) mithilfe einer bifunktionellen Fluoreszierenden Primersonde und eines Rückwärts-Primers. Der Assay liefert drei Ergebnisse: zur Identifizierung dieser Viren in den Proben dienen als Zielmoleküle konservierte Regionen der Influenza A-Viren (Matrix-Gen), der Influenza B-Viren (Matrix-Gen) und von RSV (M-Gen). Zur Überprüfung der Extraktion und zur Erkennung einer Hemmung der RT-PCR wird eine interne RNA-Kontrolle mitgeführt.

MITGELIEFERTES MATERIAL

Das Simplexa™ Flu A/B & RSV-Kit von Focus Diagnostics enthält ausreichend Reagenzien für 100 Bestimmungen. Nach Erhalt alle Komponenten des Kits bei -10 °C bis -30 ºC aufbewahren (Gefriergeräte mit Abtauautomatik sind nicht geeignet). Bei Lagerung zwischen -10 und -30 °C sind die Komponenten des Kits bis zum Ende des im Verfallsdatum auf der Verpackung genannten Monats stabil. Den Grippe-A/B & RSV-Primer-Mix (Flu A/B & RSV Primer Mix), den Master-Mix, die Grippe-A/B & RSV-Positivkontrolle (Flu A/B & RSV Positive Control), die interne RNA-Kontrolle (RNA Internal Control) und die Leerwert-Kontrolle (No Template Control) nach dem Auftauen und nach der ersten Verwendung nicht länger als 30 Tage oder bis zum Verfallsdatum bei 2 °C bis 8 °C aufbewahren, je nachdem, was zuerst eintritt. Den RT-Mix bis zum Verfallsdatum bei -10 °C bis -30 °C aufbewahren.

Beschreibung der Beschriftung des Kits und der Kit-Komponenten

Kit	**Aufschrift**
Focus Diagnostics Simplexa™ Flu A/B & RSV (Teilenummer: MOL2600)	**ENGLISCH** / **REF** / **EG-SYMBOL** **Simplexa™ Flu A/B & RSV Primer Mix** / **MOL2601** / **REAG** **A** **Simplexa™ Master Mix** / **MOL2000** / **REAG** **B** **RT-Mix** / **MOL9103** / **REAG** **C** **Simplexa™ RNA Internal Control** / **MOL2004** / **CONTROL** **IC** **Simplexa™ No Template Control** / **MOL2001** / **CONTROL** **NTC** **Simplexa™ Flu A/B & RSV Positive Control** / **MOL2602** / **CONTROL** **+**

Komponenten	**Anzahl der Röhrchen pro Kit**	**Farbcode**	**Aufschrift**			
Simplexa™ Flu A/B & RSV Primer Mix (PM)	2	Braun	REF	MOL2601	Lot	EXP
Simplexa™ Master Mix (MM)	2	Grün	REF	MOL2000	Lot	EXP
RT-Mix (RT)	1	Gelb	REF	MOL9103	Lot	EXP
Simplexa™ RNA Internal Control (RNA IC)	2	Blau	REF	MOL2004	Lot	EXP
Simplexa™ No Template Control (NTC)	2	Neutral	REF	MOL2001	Lot	EXP
Simplexa™ Flu A/B & RSV Positive Control (PC)	2	Rot	REF	MOL2602	Lot	EXP

Beschreibung der Kit-Komponenten

Kit-Komponente	**Reaktionen pro Kit/Gefäß**	**Volumen (µl) pro Gefäß**	**Beschreibung der Komponente**
Simplexa™ Flu A/B & RSV Primer Mix (PM)	100/50	30	Mit Fluoreszierendem Farbstoff markierte Primer, die Influenza A, Influenza B und RSV und die Interne Kontrolle spezifisch erkennen.
Simplexa™ Master Mix (MM)	100/50	200	DNA-Polymerase, Puffer und dNTPs
RT-Mix (RT)	100/100	50	Enzym Reverse Transkriptase, Puffer
Simplexa™ RNA Internal Control (RNA IC)	100/50	250	Verkapselte RNA-Matritze
Simplexa™ No Template Control (NTC)	8/4	800	Nukleasefreies Wasser
Simplexa™ Flu A/B & RSV Positive Control (PC)	8/4	800	Inaktiviertes Influenza A-Virus, Inaktiviertes Influenza B-Virus, Inaktiviertes RSV
Simplexa™ Flu A/B & RSV Barcode-Karte	n. z.	n. z.	Testspezifische Parameter

Target	**Sonden-Fluorophore**	**Anregung (nm)**	**Emission (nm)**	**Zielgen**
Flu A	FAM	495	520	matrix
Flu B	JOE	520	548	matrix
RSV	CFR610	590	610	M-Gen
Interne Kontrolle AR IC	Q670	644	670	n. z.

ERFORDERLICHES, JEDOCH NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

1. 3M Integrated Cycler mit Integrated Cycler Studio-Software, Version 2.1 oder höher
2. Universal Discs zur Verwendung auf dem Integrated Cycler
3. Abdeckfolie für Universal Discs
4. [a] Roche MagNA Pure LC und zugehöriges Verbrauchsmaterial
5. [aT] Roche MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Kat.- Nr. 3038505001)
6. [b] NucliSENS® easyMAG™ Gerät von bioMérieux und dazugehörige(s) Verbrauchsmaterial und Reagenzien
7. [b] Biohit/bioMérieux Mehrkanalpipette
8. [b] ELISA-Teststreifenplatte
9. Ein-, Mehrkanalmikropipette(n) und/oder Repetiermikropipette(n) mit einem Genauigkeitsbereich von 1-10 µl, 10-100 µl und 100-1000 µl
10. Gefrierschrank, -10 °C bis -30 °C (mit manueller Abtaufunktion), für die Lagerung der gefrorenen Kit-Komponenten
11. Gefrierschrank, -10 °C bis -30 °C (mit manueller Abtaufunktion), für die Lagerung der gefrorenen Proben
12. Kühlschrank mit 2 °C bis 8 °C (für aufgetaute Kit-Komponenten)
13. Biologische Sicherheitswerkbank (Laminarflow-Haube) für die Durchführung der Extraktionen
14. Mikrozentrifuge
15. Vortex-Mischer
16. Sterile, RNase/DNase-freie Einmalpipettenspitzen mit Aerosolbarriere
17. 1,5-ml-Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen und Ständer (RNase-/DNase-freie Röhrchen werden empfohlen, sind aber nicht vorgeschrieben)
18. Einweg-Schutzhandschuhe (ungepudert)
19. Nukleasefreies Wasser
20. Kühlständer für 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen

[a] Zur Verwendung beim Roche MagNA Pure LC-Extraktionsverfahren

[b] Zur Verwendung mit dem bioMérieux easyMAG Extraktionsverfahren

[T] **HINWEIS (für US-Kunden): Wenn Sie sich für die Anwendung des MagNA Pure-Extraktionsverfahrens entscheiden, dürfen nur qualifizierte Herstellerschargen des MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit mit dem Gerät verwendet werden, damit eine sachgerechte Leistung des Simplexa™ Flu A/B & RSV-Assays sichergestellt ist. Die Verwendung von Chargen, die nicht von Focus Diagnostics für die Verwendung mit dem Simplexa™ Flu A/B & RSV-Test freigegeben sind, ist nicht validiert und kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.**

Eine Liste der freigegeben Extraktionsreagenzien ist auf www.focusdx.com erhältlich. Bitte informieren Sie den Hersteller der zusätzlichen Reagenzien bei auftretenden Problemen mit diesen Reagenzien und Focus Diagnostics über die Auswirkungen dieser Probleme auf die Leistungsfähigkeit des Simplexa™ Kits.

HALTBARKEIT UND HANDHABUNG

1. Reagenzien bei -10 bis -30 °C aufbewahren (keine Gefriergeräte mit Abtauautomatik verwenden).
2. Kits und Reagenzien nach Ablauf des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
3. Primer-Mix, Master-Mix, Positivkontrolle, Interne RNA-Kontrolle und Leerwertkontrolle vor Gebrauch bei Raumtemperatur auftauen lassen (Temperaturbereich ca. 18 °C bis 25 °C).
4. Das Reaktionsgemisch nach Zugabe des RT-Mix innerhalb einer Stunde verwenden.
5. Falls das PCR-Setup nicht sofort nach Herstellung des Reaktionsgemisches durchgeführt wird, kann die Reaktionsmischung bei 2°C bis 8 °C gelagert werden, bis das PCR-Setup (innerhalb einer Stunde) durchgeführt werden kann.
6. Den RT-Mix nach jedem Gebrauch bis zum Verfallsdatum einfrieren (-10 °C bis -30 °C).
7. Primer-Mix, Master Mix, Positivkontrolle, Interne RNA-Kontrolle und Leerwert-Kontrolle aufgetaut nicht länger als 30 Tage bei 2 °C bis 8 °C aufbewahren.
8. Primer-Mix, Master-Mix, Interne RNA-Kontrolle oder Positivkontrolle nicht wieder einfrieren.
9. Keine Reagenzien aus verschiedenen Kitchargen kombinieren.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

1. *In-vitro*-Diagnostikum
2. Befolgen Sie die allgemein anerkannten Vorsichtsmaßnahmen. Sämtliche Patientenproben und Positivkontrollen sind als potenziell infektiös zu betrachten und dementsprechend zu handhaben.
3. Beim Umgang mit den Kit-Reagenzien persönliche Schutzausrüstung wie (jedoch nicht beschränkt auf) Handschuhe und Laborkittel tragen. Hände nach der Durchführung des Tests gründlich waschen.
4. Nicht mit dem Mund pipettieren.
5. In Bereichen, in denen Kit-Reagenzien und/oder Humanproben gehandhabt werden, nicht rauchen, trinken und essen nicht erlaubt. In diesen Bereichen sollten auch keine Kontaktlinsen eingesetzt/herausgenommen und kein Make-up aufgetragen werden.
6. Nicht verwendete Kit-Reagenzien bzw. Humanproben gemäß den örtlichen und nationalen Bestimmungen entsorgen.
7. Der Arbeitsablauf im Labor sollte nur in einer Richtung erfolgen: ausgehend vom/von den Prä-Amplifikationsbereich(en) in Richtung Amplifikations-/Detektionsbereich. Im folgenden Abschnitt wird der Ablauf der Arbeitsschritte von der Probenextraktion bis zur Amplifizierung mittels Echtzeit-PCR beschrieben:

- Am Anfang steht die Probenextraktion, gefolgt von der Einstellung des Geräts zur Durchführung der Echtzeit-PCR, der Zubereitung der Reagenzien und schließlich der Amplifizierung mittels Echtzeit-PCR.
- Die Verbrauchsmaterialien und Instrumente dürfen nicht bereichsübergreifend zwischen den speziellen Probenextraktions- und Probenvorbereitungsbereichen verwendet werden. Sie sollten auch nicht zwischen den verschiedenen Bereichen ausgetauscht werden.
- Verbrauchsmaterial und technische Ausstattung für die Probenvorbereitung dürfen nicht für die Reagenzienzubereitung oder zum Bearbeiten amplifizierter DNA oder anderer Quellen der Zielnukleinsäure verwendet werden.
- Sämtliches Verbrauchsmaterial und sämtliche technische Vorrichtungen für die Amplifikation müssen die ganze Zeit über im Bereich des Echtzeit-PCR-Geräts verbleiben.
- Auch die persönliche Schutzausrüstung, wie z B. Laborkittel und Einmalhandschuhe sollten bereichsspezifisch gehandhabt werden.

8. Die Kontamination von Reagenzien bzw. Patientenproben kann zu einer Verfälschung der Testergebnisse führen. Unter aseptischen Bedingungen arbeiten.
9. Die Reagenzien vorsichtig pipettieren und handhaben, um eine Kontamination mit Material aus benachbarten Kavitäten zu verhindern.
10. Geeignete Pipettiertechniken anwenden und für die Dauer des Tests das gleiche Pipettierschema einhalten, um optimale und reproduzierbare Werte zu erhalten.
11. Die Reagenzien nicht gegen Reagenzien anderer Kit-Chargen oder anderer Hersteller austauschen oder mit diesen mischen.
12. Die Verschlusskappen der Reagenzröhrchen nicht vertauschen. Dies könnte zu Kontaminationen und zur Beeinträchtigung der Testergebnisse führen.
13. Nur das in diesem Beipackzettel beschriebene Protokoll verwenden. Bei Nichteinhaltung des Protokolls oder der angegebenen Zeiten oder Temperaturen kann es fehlerhaften Testergebnissen kommen.
14. Der Testansatz sollte bei Raumtemperatur (Temperaturbereich ca. 18 °C bis 25 °C) erfolgen. Beim Mischen der Reagenzien die Enzyme gekühlt halten, indem ein Kühlblock verwendet wird.
15. Universal Discs, die bereits in Kontakt mit Patientenproben oder Reagenzien gekommen sind, nicht wieder verwenden.
16. Gebrauchte Discs ohne Abnehmen oder Entfernen der Abdeckfolie entsorgen.
17. Wenn verschiedene Simplexa™ Kits auf der gleichen Disc angesetzt werden, müssen die Positiv- und Leerwert-Kontrollen aus jedem verwendeten Kit getestet werden.
18. Master-Mix und RT-Mix enthalten > 1% Glycerin, welches bei Inhalation oder Hautkontakt zu Reizungen führen kann. Nach Einatmen oder Berührung sollten Erste-Hilfe-Maßnahmen eingeleitet werden.
19. Eine längere Aufbewahrung extrahierter Proben bei 2 °C bis 8 °C wird nicht empfohlen; es wurde keine Prüfung der Leistung unter solchen Bedingungen durchgeführt.

GEBRAUCHSANWEISUNG

A. PROBENGEWINNUNG

Geeignete Probentypen sind beispielsweise Abstriche aus dem Nasenrachenraum (NPS) in sterilem Virustransportmedium mit Proteinstabilisator, Antibiotika gegen Wachstum von Bakterien und Pilzen und Pufferlösung (z. B. UTM, VCM, M4, M5, M6 und andere Medien, die für den Transport von Chlamydien, Mykoplasmen und Viren bestimmt sind). Nur Abstrichtupfer mit synthetischer Spitze (z. B. Dacron, Nylon oder Rayon) und einem Schaft aus Aluminium oder Kunststoff verwenden. Keine Kalziumalginattupfer verwenden, da diese Stoffe enthalten können, welche die PCR hemmen.

B. PROBENEXTRAKTIONSBEREICH

In einem speziellen, der Extraktion von Proben und Kontrollen vorbehaltenen Bereich arbeiten. Die Vorbereitung der Proben für die Extraktion wird auf einer biologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Extraktion mit dem MagNA Pure LC-Extraktionsverfahren von Roche

1. Die Extraktion von Nukleinsäuren aus Patientenproben und Assaykontrollen erfolgt mit dem MagNA Pure Total Nucleic Acid-Kit von Roche und dem MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid Extractor-Gerät von Roche. Hinsichtlich der Nukleinsäureextraktion mit diesem Kit die Gebrauchsanweisungen des Herstellers beachten.
2. Im Dropdownmenü „Protocol“ des MagNA Pure LC-Systems die Optionen „Total NA“ und anschließend „Total NA Variable_elution_volume.blk“ wählen. Damit werden die passenden Einstellungen für den Lauf geladen.
3. Das Probenprotokoll sollte „Total NA Variable_elution_volume“ sein.
4. Als Probenvolumen sollte 200 µl und als Elutionsvolumen 50 µl eingestellt sein.
5. Das Verdünnungsvolumen sollte für alle Proben auf Null eingestellt sein.
6. Das „Post Elution Protocol“ muss auf „None“ eingestellt sein.
7. Überprüfen Sie, ob Proben und Kontrollen sich auf der Probenkartusche in der richtigen Position befinden.
8. Jede Probe und die Positivkontrolle 2-4 Sekunden vortexen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
9. 200 µl von jeder Probe, Positiv- und Leerwert-Kontrolle in die entsprechende Position in der Probenkartusche pipettieren.
10. Den Füllpegel der Proben und Kontrollen in der Probenkartusche einer Sichtprüfung unterziehen, um sicherzustellen, dass Probe(n) zugegeben wurde(n).
11. Die Interne RNA-Kontrolle 2 Mal kurz vortexen und zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.

12. In jede Proben- und alle Kontroll-Kavitäten 5 µl Interne RNA-Kontrolle pipettieren. Zwischen den Proben die Pipettenspitze wechseln.
13. Die Probenkartusche mit den Proben in das MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid-Extraktionsgerät überführen und die Extraktion starten.
14. Nach Abschluss der Nukleinsäureextraktion kann die Kartusche mit den extrahierten Kontrollen und Patientenproben aus dem MagNA Pure-Extraktor herausgenommen und verschlossen werden. Die extrahierte RNA vor der Verwendung bei 2-8 °C aufbewahren. Die Langzeitaufbewahrung extrahierter Proben bei dieser Temperatur wird nicht empfohlen. Extrahierte RNA-Proben beim Beschicken der Disc auf einem Kühlblock aufbewahren.

Extraktion mit dem NucliSENS® easyMAG™-Extraktionsverfahren von bioMérieux

1. *Zur Bedienung von Gerät und Software ist das Benutzerhandbuch des NucliSENS® easyMAG™ zu beachten.*
2. In der NucliSENS® easyMAG™ Software die Vorlage „Generic“ (Allgemein) mit folgenden Einstellungen wählen:
   Default Request (Standardanfrage): Generic 2.0.1 (oder äquivalent)
   Run Name Prefix (Vorsilbe der Laufbezeichnung): (beliebig)
   Sample ID prefix (Vorsilbe der Proben-ID): (beliebig)
   Sample Type (Probentyp): Primary (Primär)
   Workflow Defaults (Standardarbeitsabläufe): On-board lysis Incubation (Lyse-Inkubation im Gerät)
   On-board Silica Incubation (Inkubation mit Silica im Gerät)
   Sample Addition Guidance Off (Hinweise zur Zugabe von Proben aus)
   Reagent Tracking (Rückverfolgung der Reagenzien): Lysis, Silica, Internal Control reagent tracking disabled (Rückverfolgung von Lyse-Reagenz, Silica und interner Kontrolle deaktiviert)
3. Die individuellen Probendaten im Bildschirm „Extraction Request“ (Extraktionsanforderung) folgenderweise eingeben:
   Sample ID (Proben-ID): (Probenbezeichnung eingeben)
   Request (Anfrage): Generic 2.0.1 (oder äquivalent)
   Volume (Volumen) (mL): 0,200
   Eluate (Eluat) (µl): 50
   Type (Typ): Primary (Primär)
   Priority (Priorität): Normal
   Matrix: Other (Andere)

4. Nach den Angaben im Benutzerhandbuch in der NucliSENS® easyMAG™ Software einen „Extraction Run“ (Extraktionslauf) erstellen.
5. Jede Probe und die Positivkontrolle 2-4 Sekunden vortexen und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
6. 200 µl der Probe, der Positiv- und der Leerwertkontrolle in die Probengefäße pipettieren.
7. Die Interne RNA-Kontrolle 2 Mal kurz vortexen und zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
8. In jede Proben- und alle Kontroll-Kavitäten 5 µl Interne RNA-Kontrolle pipettieren. Zwischen den Proben die Pipettenspitze wechseln.
9. Nach den Angaben im Benutzerhandbuch das/die Probengefäß(e), neue Verbrauchsmaterialien für den Aspirator und Reagenzien in das easyMAG™ Gerät laden.
10. Die Lyse im Gerät starten und die lysierten Proben 10 Minuten inkubieren, bevor das magnetische Silica-Gemisch zugegeben wird.
11. Das magnetische Silica-Gemisch während der Lyse-Inkubation vorbereiten. Silica mischen und mit nukleasefreiem Wasser verdünnen, indem 1 Teil magnetisches Silica zu 3 Teilen nukleasefreiem Wasser gegeben wird (z. B. 270 µl magnetisches Silica + 810 µl nukleasefreies Wasser). Je Probe mindestens 135 µl magnetisches Silica-Gemisch vorbereiten.
12. Zum Übertragen des magnetischen Silica-Gemisches in die Kavitäten der ELISA-Teststreifen das magnetische Silica-Gemisch mischen und 1 Spitze sowie den Betriebsmodus P2 der Biohit-Pipette verwenden. Auf **Start** drücken, um 1050 µl des magnetischen Silica-Gemisches anzusaugen, und nochmals auf **Start** drücken, um das erste Volumen zurück in das Röhrchen mit Silica-Gemisch auszuwerfen. Auf **Start** drücken, um 125 µl des magnetischen Silica-Gemisches in 8 einzelne Kavitäten des ELISA-Teststreifens zu pipettieren.
13. Nach Bedarf für weitere ELISA-Teststreifen wiederholenNach der 10-minütigen Lyseinkubation 8 Spitzen (je ELISA-Teststreifen) und den Betriebsmodus P3 der Biohit-Pipette verwenden, um jeder Probe in dem Probengefäß 100 µl des magnetischen Silica-Gemisches zuzugeben. Die Spitzen in die Kavitäten der ELISA-Teststreifen geben und **Start** drücken, um das magnetische Silica-Gemisch zu mischen und anzusaugen.
14. Das magnetische Silica-Gemisch in das jeweilige Probengefäß geben und die Pipettenspitzen(n) in die Proben abwerfen. Sie sollten sich unterhalb des Flüssigkeitsspiegels befinden. Auf **Start** drücken, um das magnetische Silica anzusaugen, zu pipettieren und mit den Proben zu mischen (3x). Die Pipettenspitzen müssen unterhalb des Flüssigkeitsspiegels bleiben, damit der Mischvorgang korrekt ausgeführt wird.
15. Schritt 11 und 12 für weitere Probengefäße wiederholen, dabei jeweils neue Spitzen verwenden.
16. Nach Zugabe des magnetischen Silica-Gemisches zu allen Probengefäßen den Extraktionslauf starten.
17. Nach Abschluss des Laufs die Probengefäße aus dem Gerät nehmen. Werden die Proben nicht sofort weiterverwendet, in individuelle Röhrchen überführen, um die Chance, dass magnetisches Silica zurück in die Probe fällt, zu minimieren. Die extrahierte RNA bis zum Gebrauch bei 2-8 °C aufbewahren. Die Langzeitaufbewahrung extrahierter Proben bei

dieser Temperatur wird nicht empfohlen. Extrahierte RNA-Proben beim Laden der Disc auf einem Kühlblock aufbewahren.

C. EINSTELLUNG DES GERÄTS FÜR DIE ECHTZEIT-PCR

1. Im Bedienungshandbuch für den Integrated Cycler wird detailliert beschrieben, wie die Integrated Cycler Studio Software im einzelnen zu konfigurieren ist, um auf dem Integrated Cycler Assays zu definieren sowie Läufe einzurichten und zu analysieren.

D. REAGENZIENZUBEREITUNGSBEREICH

Spezieller Bereich, welcher der Zubereitung des Simplexa™ Flu A/B & RSV-Assay-Reaktionsgemisches vorbehalten ist.

1. Primer Mix und Master Mix bei Raumtemperatur (etwa 18°C bis 25 °C) auftauen. Jedes Röhrchen im Kit enthält eine für 50 Reaktionen ausreichende Reagenzienmenge. Vor jedem Gebrauch Primer Mix- und Master Mix-Komponenten 6 bis 8 mal vorsichtig umdrehen, um sie zu durchmischen, und kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
2. In ein Polypropylen-Mikrozentrifugenröhrchen jede Komponente in dem in der folgenden Tabelle angegebenen Volumen pipettieren, um das erforderliche Volumen des Reaktionsgemisches zuzubereiten.

Reaktionsgemischvolumen

Reagens	Reaktionsgemisch-Volumen / 1 Reaktion	Reaktionsgemisch-Volumen / 10 Reaktionen
Simplexa™ Master Mix	4,0 µl	40 µl
Simplexa™ Flu A/B & RSV Primer Mix	0,5 µl	5 µl
RT-Mix	0,5 µl	5 µl
Gesamtvolumen	5,0 µl	50 µl

3. Das Reaktionsgemisch durch Umdrehen des Röhrchens oder durch 8- bis 10-maliges Pipettieren vorsichtig mischen.
4. Kurz zentrifugieren, um die Inhaltsstoffe auf den Boden des Röhrchens zu ziehen.
5. Mit der Vorbereitung der PCR fortfahren.
6. Das Reaktionsgemisch nach der Zubereitung innerhalb von einer Stunde verwenden. Falls das PCR-Setup nicht sofort nach Herstellung des Reaktionsgemisches durchgeführt wird, kann die Reaktionsmischung bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden, bis das PCR-Setup (innerhalb einer Stunde) durchgeführt werden kann.

E. BEREICH FÜR DIE ECHTZEIT-PCR-AMPLIFIKATION

In einem speziellen, der Vorbereitung der Universal Disc mit 96 Kavitäten für den Simplexa™ Flu A/B & RSV-Assay vorbehaltenen Bereich arbeiten.

1. In jede Kavität 5,0 µl des Reaktionsgemischs geben.
2. Der mit „PC“ markierten Kavität auf der Disc 5,0 µl der extrahierten Positivkontrolle hinzufügen.
3. Der mit „S“ markierten Kavität auf der Disc 5,0 µl der extrahierten Patientenprobe hinzufügen.
4. Der mit „NTC“ markierten Kavität auf der Disc 5,0 µL der extrahierten Leerwert-Kontrolle hinzufügen.
5. Die Disc mit dem Universal Disc Cover Tape abdecken.
6. Die Universal Disc in den Integrated Cycler laden und den Lauf starten.

F. DATENANALYSE

1. Nach Beendigung des Laufs auf Analyze (Analysieren) klicken.
2. Die Kanäle nacheinander oder alle Kanäle auf einmal prüfen.
3. Die Schaltfläche Print Preview (Druckvorschau) (unten rechts) drücken, dann die Auswahlkästchen Include Graphs (Diagramme einschließen) und Include Ct Values (Ct-Werte aufnehmen) markieren, um eine Übersicht der Ct-Werte und die Amplifikationsdiagramme zu erhalten.Die Seiten mithilfe der Pfeiltasten oben links im Fenster Print Preview (Druckvorschau) durchsehen.
4. Den Bericht nach Bedarf ausdrucken oder abspeichern.
5. Die Ct-Werte ggf. exportieren.

ERSTELLUNG VON ERGEBNISBERICHTEN

Die Erstellung von Ergebnisberichten ist ein dreistufiger Prozess.

1. Überprüfung der Kontrollen um festzustellen, ob der Lauf gültig ist. Die Integrated Cycler Studio Software unterdrückt die Interpretation der Patientenergebnisse, falls die als Kontrollen programmierten Proben ungültig sind.
2. Überprüfung der Validität von Patientenprobenergebnissen.
3. Interpretation der Patientenergebnisse. Wenn die Kontrollen nicht valide sind, können die Patientenergebnisse nicht ausgewertet werden.
4. Durch Überprüfung der Flu A/B- und RSV-Positivkontrollen, der Leerwert-Kontrolle und der internen RNA-Kontrolle die Validität des Laufs ermitteln.

Kriterien für eine valide Kontrolle (vereinfacht)*

Kontrolle	Flu A Ct	Flu B Ct	RSV, Ct	RNA IK, Ct
Leerwert-Kontrolle	0	0	0	≤40, ≠0
Positivkontrolle	≤40, ≠0	≤40, ≠0	≤40, ≠0	Nicht zutreffend (N/A)

* Siehe vollständige Beschreibung in den nachstehenden Anmerkungen.

a. No Template Control (Leerwert-Kontrolle):
   i. Wenn die Leerwert-Kontrolle ein positives Ergebnis zeigt (Ct-Wert ≤40, ≠0 für Flu A, Flu B oder RSV), weist dies darauf hin, dass die vorbereiteten Proben möglicherweise kontaminiert sind. Die Kontrolle ist ungültig und alle Patientenproben müssen erneut getestet werden.
   ii. Wenn die RNA IK bei der Leerwert-Kontrolle nicht nachgewiesen wird, ist der Assay-Lauf ungültig und alle Patientenproben müssen erneut getestet werden.
   iii. Wenn die Leerwert-Kontrolle für Flu A, Flu B und RSV-Detektor ein negatives Ergebnis zeigt (Ct = 0) UND wenn die RNA IK bei der Leerwert-Kontrolle nachgewiesen wird, ist diese Kontrolle gültig und akzeptabel.

b. Positivkontrolle
   i. Wenn das Ergebnis der Positivkontrolle für Flu A, Flu B oder RSV Ct=0 lautet, so gilt der **Assay-Lauf** als ungültig und nicht akzeptabel. **Alle Patientenproben müssen erneut getestet werden.**
   ii. Wenn die Ct-Werte für **Flu A, Flu B und RSV** ≤40 und ≠0 sind, gilt der Assay-Lauf als valide und akzeptabel.

c. Interne RNA-Kontrolle
   i. Zur Angabe eines negativen Ergebnisses ist eine Detektion der Simplexa™ internen RNA-Kontrolle (RNA IK) erforderlich.
   ii. Zur Angabe eines positiven Ergebnisses ist eine Detektion der Simplexa™ internen RNA-Kontrolle (RNA IK) nicht erforderlich.

2. Überprüfung von Patientenprobenergebnissen
Die Überprüfung von Ergebnissen klinischer Proben muss erfolgen, nachdem die Positiv- und die Leerwert-Kontrolle überprüft und für valide und akzeptabel befunden worden sind. Für jede Patientenprobe müssen die Flu A-, Flu B-, RSV-Ergebnisse und die Ergebnisse der internen RNA-Kontrolle überprüft werden.

a. Bei jedem Ergebnis mit einer "Data Quality"-Meldung sind die Amplifizierungsdiagramme zu überprüfen. Wählen Sie in der Registerkarte **Data** (Daten) die Kurve aus, die Sie überprüfen möchten und klicken Sie auf **Refresh** (Aktualisieren). Die Software zeichnet die ausgewählten Kurven und passt die Skala des Diagramms an. Eine gültige Amplifizierungskurve zeigt einen glatten, exponentiellen Anstieg. Eine ungültige Amplifizierungskurve kann einen nicht-exponentiellen oder linearen Anstieg mit „Spitzen" zeigen, die möglicherweise die Grenzwerte überschreiten. Falls die Kurve als gültig beurteilt wird, kann der ausgegebene Ct-Wert verwendet werden, um wie in Abschnitt 3 unten beschrieben zu beurteilen, ob die Flu A-, Flu B- oder RSV-Targets detektiert wurden.
b. Wenn die Amplifizierungskurve für Flu A, Flu B oder RSV valide ist, ist eine Erkennung der internen RNA-Kontrolle nicht erforderlich, um ein positives. Ergebnis angeben zu können.

Interpretation der Ergebnisse

Beispiel	*Flu A Ct-Wert*	*Flu B Ct-Wert*	*RSV Ct-Wert*	*Ct-Wert der Internen RNA-Kontr.**	*Interpretation*
1	*0*	*0*	*0*	≤40, ≠0	*Flu A, Flu B und RSV nicht detektiert*
2	≤40, ≠0	*0*	*0*	*n. z.*	*Flu A detektiert*
3	*0*	≤40, ≠0	*0*	*n. z.*	*Flu B detektiert*
4	*0*	*0*	≤40, ≠0	*n. z.*	*RSV detektiert*
5	≤40, ≠0	≤40, ≠0	*0*	*n. z.*	*Flu A und Flu B detektiert*
6	*0*	≤40, ≠0	≤40, ≠0	*n. z.*	*Flu B und RSV detektiert*
7	≤40, ≠0	*0*	≤40, ≠0	*n. z.*	*Flu A und RSV detektiert*
8	≤40, ≠0	≤40, ≠0	≤40, ≠0	*n. z.*	*Flu A, Flu B und RSV detektiert***
9	*0*	*0*	*0*	0	*Ungültig, erneut extrahieren und Test wiederholen*

Ct = Zyklus-Schwellenwert. Detektiert ist Ct ≤40, ≠0. Nicht detektiert ist Ct = 0, *Eine Detektion der Simplexa™ internen RNA-Kontrolle ist nicht erforderlich, **um ein positives Ergebnis angeben zu können.** ** Aufgrund der niedrigen Inzidenz einer DreifachInfektion mit Influenza A, Influenza B und RSV wird empfohlen, Proben, in denen Nukleinsäuren aller drei Analyte nachgewiesen werden, noch einmal zu testen.

MESSBEREICH

Die Proben aus den klinischen Studien, die positiv getestet wurden, wiesen Ct-Werte für Flu A im Bereich von 14,9-31,2, Ct-Werte für Flu B im Bereich von 15,9-33,5 und Ct-Werte für RSV im Bereich von 14,4-35,3 auf. Bei den meisten Proben ergeben sich für jedes Target Ct-Werte <35.

QUALITÄTSKONTROLLE

Qualitätskontrollbereiche wurden wie in der folgenden Tabelle angegeben ermittelt. Weichen die Kontrollen von diesen Parametern ab, so sollten die Patientenprobenergebnisse als ungültig angesehen und der Test wiederholt werden. Jedes Labor sollte, ausgehend von den vor Ort geltenden Gesetzen, Bestimmungen und der üblichen guten Laborpraxis, eigene Qualitätskontrollbereiche wie auch die Häufigkeit der Qualitätskontrollen ermitteln.

Erwartete Kontrollbereiche

Art der Kontrolle	Simplexa™ Flu A/B & RSV Positivkontrolle Flu A Ct-Wert	Simplexa™ Flu A/B & RSV Positivkontrolle Flu B Ct-Wert	Simplexa™ Flu A/B & RSV Positivkontrolle RSV Ct-Wert	Simplexa™ interne RNA-Kontrolle (RNA IK)
Leerwert-Kontrolle	Ct = 0	Ct = 0	Ct = 0	Ct < 40
Positivkontrolle	Ct ≤40, ≠0	Ct ≤40, ≠0	Ct ≤40, ≠0	nicht zutreffend*

* Eine Detektion der Simplexa™ internen RNA-Kontrolle (RNA IK) ist für ein gültiges Ergebnis nicht erforderlich.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Die Personen, die die Analyse durchführen, sollten sich für der Durchführung des Assays eingehend mit den Testverfahren und der Ergebnisinterpretation vertraut gemacht haben.
2. Die Detektion der viralen Nukleinsäuren hängt von der ordnungsgemäßen Entnahme, Handhabung, Aufbewahrung und dem Transport der Proben, sowie von der Probenvorbereitung einschließlich der Extraktion ab. Mangelnde Beachtung der ordnungsgemäßen Vorgehensweise bei einem dieser Schritte kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
3. Alle Testergebnisse aus diesen und anderen Tests müssen mit der klinischen Anamnese, den epidemiologischen Daten und allen anderen Daten, die dem zuständigen Arzt vorliegen, korrelieren.
4. Die Prävalenz der Infektion beeinflusst den prädiktiven Wert des Assays.
5. Wie bei anderen Tests auch, schließen negative Ergebnisse eine Infektion mit Influenza A, Influenza B oder RSV nicht aus und dürfen nicht als alleinige Grundlage für die Behandlung oder andere Entscheidungen bezüglich der Versorgung des Patienten herangezogen werden.
6. Falls der die Infektion verursachende Organismus Genmutationen, Insertionen, Deletionen oder Rearrangements aufweist oder wenn die Testung früh im Krankheitsverlauf vorgenommen wird, kann es zu falsch negativen Ergebnissen kommen.
7. Falsch negative Ergebnisse können auftreten, wenn in der Probe aufgrund falscher Entnahme, falschen Transports oder falscher Handhabung zu wenig Organismen vorhanden sind.
8. Es können falsch positive Ergebnisse auftreten. Eine Wiederholung des Tests oder die Durchführung des Tests mit einem anderen Instrument könnte in manchen Fällen indiziert sein.
9. Virale Nukleinsäuren können *in vivo* auch unabhängig von lebensfähigen Viren erhalten bleiben. Die Detektion eines Targets bedeutet nicht, dass die entsprechenden Viren infektiös sind oder dass Sie die Ursache für die klinischen Symptome sind.
10. Bei dem Assay handelt es sich um ein qualitatives Testverfahren, das keine Aussage über die Gesamtmenge der detektierten Erreger erlaubt.
11. Die Leistungsfähigkeit dieses Tests wurde nur mit Humanproben untersucht.
12. Die Leistungsfähigkeit dieses Tests wurde für keine anderen Probentypen außer für Nasenrachenabstriche bestimmt.
13. Die Leistungsfähigkeit dieses Tests wurde bei Personen mit eingeschränktem Immunsystem nicht untersucht.
14. Die Leistungsfähigkeit dieses Assays wurde nicht für Patienten ermittelt, die asymptomatisch für eine Virusinfektion der Atemwege sind.
15. Die Leistungsfähigkeit dieses Assays zur Überwachung einer Therapie bei einer Infektion mit Influenza A, Influenza B oder RSV wurde nicht bestimmt.
16. Die Leistungsfähigkeit dieses Assays für die Testung von Blut oder Blutprodukten für den Nachweis von Influenza A, Influenza B oder RSV wurde nicht bestimmt.
17. Die Leistungsfähigkeit dieses Assays wurde nicht in Bezug auf Medikamente zur Behandlung von Influenza- oder Erkältungsviren ermittelt, mit denen sich potenzielle Wechselwirkungen ergeben können.
18. Die Leistungsfähigkeit dieses Assays wurde nicht für Patienten ermittelt, die den Influenza-Impfstoff erhalten haben.
19. Dieser Assay kann keine Atemwegserkrankung ausschließen, die durch andere bakterielle oder virale Erreger verursacht wird.

SPEZIFISCHE LEISTUNGSDATEN

METHODENVERGLEICH

An der Studie der klinischen Übereinstimmung nahmen drei externe Prüfstellen teil. Referenzergebnisse für Influenza A- und Influenza B-Viren wurden mithilfe eines von der FDA freigegeben leistungsfähigen Nukleinsäuretests (NAT) erstellt. Die Referenzergebnisse für RSV wurden mithilfe von Kulturen/DFA erstellt. Die Kultur/DFA-Ergebnisse stammten aus Tests zum Zeitpunkt der Probennahme oder Probenarchivierung. Aus prospektiv gesammelten Proben (n = 558) von Patienten mit Anzeichen und Symptomen einer Virusinfektion der Atemwege und retrospektiv archivierten Proben von Patienten mit Anzeichen und Symptomen einer Virusinfektion der Atemwege wurden insgesamt 735 Nasenrachenabstrichproben verwendet. Die Zusammenstellung der prospektiven Proben erfolgte in Bundesstaaten im Süden der USA vom 26. Februar 2010 bis 24. März 2010 und in Australien vom 4. Juli 2010 bis 17. August 2010. Drei (3) Proben wurden wegen des Status „Nicht eindeutig“ im

Referenz-Nukleinsäuretest aus der prospektiven Analyse ausgeschlossen, und zwei (2) Proben wurden wegen des Status „ungültig“ im Simplexa-Assay ausgeschlossen. Die Proben waren auch nach Testwiederholung entweder nicht eindeutig oder ungültig. Eine (1) Probe wurde aufgrund nicht vorliegender Kultur/DFA-Ergebnisse für RSV aus der prospektiven Analyse ausgeschlossen. Aufgrund der niedrigen Prävalenzrate von Influenza während der Probensammlung und der Seltenheit von RSV bei Erwachsenen wurden außerdem retrospektiv gesammelte Proben aus der Grippe- und RSV-Saison 2008-2009 und Anfang 2010 von Patienten mit Anzeichen und Symptomen einer viralen Atemwegsinfektion in Bundestaaten im Osten und mittleren Westen der USA untersucht (n = 177). Von den 177 gesammelten Proben wurden 47 nicht per Kultur/DFA auf Influenza A oder Influenza B untersucht.

Influenza A Zusammenfassung der klinischen Übereinstimmung – Prospektive Proben

*Leistungsfähiger NAT[1]		Simplexa		
	n	Detektiert	Nicht detektiert	% Übereinstimmung
Detektiert	25	25	0	100 %(25/25) 95 % CI:86,7-100 %
Nicht detektiert	528	1	527	99,8%(527/528) 95% CI:98,9-100%

Kultur/DFA		Simplexa		
	n	Detektiert	Nicht detektiert	Sensitivität/ Spezifität
Detektiert	22	22	0	100%(22/22) 95% CI:85,1-100%
Nicht detektiert	534	4	530	99,3%(530/534) 95% CI:98,1-99,7%

Influenza B Zusammenfassung der klinischen Übereinstimmung – Prospektive Proben

*Leistungsfähiger NAT		Simplexa		
	n	Detektiert	Nicht detektiert	% Übereinstimmung
Detektiert	2	1	1	50%(1/2) 95% CI:9,5-90,5%
Nicht detektiert	551	1	550	99,8%(550/551) 95% CI:99-100%

Kultur/DFA		Simplexa		
	n	Detektiert	Nicht detektiert	Sensitivität/ Spezifität
Detektiert	1	1	0	100%(1/1) 95% CI:20,7-100%
Nicht detektiert	555	1	554	99,8%(554/555) 95% CI:99-100%

RSV Zusammenfassung der klinischen Übereinstimmung – Prospektive Proben

hoher Leistung		Simplexa		
	n	Detektiert	Nicht detektiert	% Übereinstimmung
Detektiert	111	110	1	99,1%(110/111) 95% CI:95,1-99,8%
Nicht detektiert	442	2	440	99,5%(440/442) 95% CI:98,4-99,9%

*Kultur/DFA		Simplexa		
	n	Detektiert	Nicht detektiert	Sensitivität/ Spezifität
Detektiert	100	98	2	98%(98/100) 95% CI:93-99,4%
Nicht detektiert	455	14	441	96,9%(441/455) 95% CI:94,9-98,2%

Influenza A Zusammenfassung der klinischen Übereinstimmung – Retrospektive Proben

*NAT mit hoher Leistung		Simplexa		
	n	Detektiert	Nicht detektiert	% Übereinstimmung
Detektiert	79	79	0	100%(79/79) 95% CI:95,4-100%
Nicht detektiert	98	1	97	99%(97/98) 95% CI:94,4-99,8%

Kultur/DFA		Simplexa		
	n	Detektiert	Nicht detektiert	Sensitivität/ Spezifität
Detektiert	80	80	0	100%(80/80) 95% CI:95,4-100%
Nicht detektiert	50	0	50	100%(50/50) 95% CI:92,9-100%

Influenza B Zusammenfassung der klinischen Übereinstimmung – Retrospektive Proben

*NAT mit hoher Leistung		Simplexa		
	n	Detektiert	Nicht detektiert	% Übereinstimmung
Detektiert	50	50	0	100%(50/50) 95% CI:92,9-100%
Nicht detektiert	127	0	127	100%(127/127) 95% CI:97,1-100%

Kultur/DFA		Simplexa		
	n	Detektiert	Nicht detektiert	Sensitivität/ Spezifität
Detektiert	50	50	0	100%(50/50) 95% CI:92,9-100%
Nicht detektiert	93	0	93	100%(93/93) 95% CI:96-100%

RSV Zusammenfassung der klinischen Übereinstimmung – Retrospektive Proben

NAT		Simplexa		
	n	Detektiert	Nicht detektiert	% Übereinstimmung
Detektiert	22	22	0	100%(22/22) 95% CI:85,1-100%
Nicht detektiert	155	1	154	99,4%(154/155) 95% CI:96,4-99,9%

*Kultur/DFA		Simplexa		
	n	Detektiert	Nicht detektiert	Sensitivität/ Spezifität
Detektiert	22	22	0	100%(22/22) 95% CI:85,1-100%
Nicht detektiert	25	1	24	96%(24/25) 95% CI:80,5-99,3%

[1]Leistungsfähiger NAT = Von der FDA freigegebener leistungsfähiger Nukleinsäuretest
*Referenzmethode zur Untersuchung der klinischen Leistung zur Freigabe nach 510(k).

REPRODUZIERBARKEIT

Drei Prüfzentren bestimmten die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit dem Gerät zwischen Labors (Inter-Labor-Reproduzierbarkeit) sowie die Reproduzierbarkeit zwischen und innerhalb von Tests (Inter-/Intra-Assay-Reproduzierbarkeit). Jedes der drei Laboratorien untersuchte neun Proben, die Positivkontrolle und die Leerwert-Kontrolle an fünf verschiedenen Tagen in dreifacher Ausfertigung. An jedem Prüfzentrum gab es zwei Personen (Operators), von denen jede den Test einmal pro Tag durchführte (d. h. insgesamt fanden pro Tag 2 Läufe statt). Zwei Prüfzentren führten die Extraktion mit dem MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit durch; zwei Prüfzentren führten den Extraktionsschritt mit dem NucliSENS® easyMAG™ von bioMérieux durch. Die zusammengefassten Ergebnisse aller drei Prüfzentren sind in den folgenden Tabellen aufgelistet. Zur Berechnung der Mittelwerte und Streuungskomponenten wurde Proben, die ein negatives Ergebnis (Ct=0) aufwiesen, ein Wert von 40,0 zugewiesen, da ein Wert von 40,0 eher negativen Proben mit Ct-Werten am oberen Grenzwert des Bereichs entspricht.

Reproduzierbarkeit – Flu A

Probe	Prüfzentrum 1			Prüfzentrum 2			Prüfzentrum 3				
	Überein-stimmung mit den erwarteten Ergebnissen	Durchschn. Ct	Gesamt % VK	Überein-stimmung mit den erwarteten Ergebnissen	Durchschn. Ct	Gesamt % VK	Überein-stimmung mit den erwarteten Ergebnissen	Durchsch n. Ct	Gesamt % VK	Gesamtüberein-stimmung mit den erwarteten Ergebnissen	95% CI
Leerwert-Kontrolle	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100%)	95.9% - 100,0%
Positivkontrolle	30/30	30,2	1,6	30/30	29,6	1,5	30/30	29,8	1,3	90/90 (100%)	95.9% - 100,0%
Flu A hoch negativ	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100%)	95.9% - 100,0%
Flu A schwach positiv	30/30	33,0	0,9	30/30	33,3	1,3	30/30	33,5	2,1	90/90 (100%)	95.9% - 100,0%
Flu A medium positiv	30/30	29,6	0,9	30/30	29,4	0,6	30/30	29,5	0,8	90/90 (100%)	95.9% - 100,0%
Flu B hoch negativ	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100%)	95.9% - 100,0%
Flu B schwach positiv	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100%)	95.9% - 100,0%
Flu B medium positiv	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100%)	95.9% - 100,0%
RSV hoch negativ	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100%)	95.9% - 100,0%
RSV schwach positiv	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100%)	95.9% - 100,0%
RSV medium positiv	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100%)	95.9% - 100,0%
Gesamtübereinstimmung	330/330 (100.0%)			330/330 (100,0%)			330/330 (100,0%)			990/990 (100,0%)	99.6% – 100,0%

Reproduzierbarkeit - Flu B

Probe	Prüfzentrum 1			Prüfzentrum 2			Prüfzentrum 3				
	Übereinstimmung mit den erwarteten Ergebnissen	Durchschn. Ct	Gesamt % VK	Übereinstimmung mit den erwarteten Ergebnissen	Durchschn. Ct	Gesamt % VK	Übereinstimmung mit den erwarteten Ergebnissen	Durchschn. Ct	Gesamt % VK	Gesamtübereinstimmung mit den erwarteten Ergebnissen	95% CI
Leerwert-Kontrolle	30/30	40,0	0.0	30/30	40.0	0.0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100%)	95.9% - 100.0%
Positivkontrolle	30/30	28,8	1.2	30/30	28.4	1.0	30/30	28,1	1,5	90/90 (100%)	95.9% - 100.0%
Flu A hoch negativ	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100%)	95,9% - 100,0%
Flu A schwach positiv	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100%)	95,9% - 100,0%
Flu A medium positiv	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100%)	95,9% - 100,0%
Flu B hoch negativ	30/30	40,0	0,0	29/30	39,2	11,7	30/30	40,0	0,0	89/90 (98,9%)	94,0% - 100,0%
Flu B schwach positiv	30/30	33,8	1,2	26/30	35,3	5,7	25/30	35,0	6,7	81/90/90,0%)	82,1% - 100,0%
Flu B medium positiv	30/30	30,4	0,7	30/30	30,1	0,5	30/30	29,9	1,2	90/90 (100%)	95,9% - 100,0%
RSV hoch negativ	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100%)	95,9% - 100,0%
RSV schwach positiv	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100%)	95,9% - 100,0%
RSV medium positiv	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100%)	95,9% - 100,0%
Gesamtübereinstimmung	330/330 (100,0%)			325/330 (98,5%)			325/330 (98,5%)			980/990 (99,0%)	98,2% - 99,5%

Reproduzierbarkeit – RSV

Probe	Prüfzentrum 1			Prüfzentrum 2			Prüfzentrum 3				
	Übereinstimmung mit den erwarteten Ergebnissen	Durchschn. Ct	Gesamt % VK	Übereinstimmung mit den erwarteten Ergebnissen	Durchschn. Ct	Gesamt % VK	Übereinstimmung mit den erwarteten Ergebnissen	Durchschn. Ct	Gesamt % VK	Gesamtübereinstimmung mit den erwarteten Ergebnissen	95% CI
Leerwert-Kontrolle	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100,0%)	95,9% - 100,0%
Positivkontrolle	30/30	31,1	2,9	30/30	29,4	3,2	30/30	28,4	2,7	90/90 (100,0%)	95,9% - 100,0%
Flu A hoch negativ	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100,0%)	95,9% - 100,0%
Flu A schwach positiv	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100,0%)	95,9% - 100,0%
Flu A medium positiv	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100,0%)	95,9% - 100,0%
Flu B hoch negativ	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100,0%)	95,9% - 100,0%
Flu B schwach positiv	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100,0%)	95,9% - 100,0%
Flu B medium positiv	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100,0%)	95,9% - 100,0%
RSV hoch negativ	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	30/30	40,0	0,0	90/90 (100,0%)	95,9% - 100,0%
RSV schwach positiv	30/30	33,8	4,5	30/30	33,3	3,6	30/30	32,3	2,0	90/90 (100,0%)	95,9% - 100,0%
RSV medium positiv	30/30	30,4	4,3	30/30	28,6	4,4	30/30	28,5	4,1	90/90 (100,0%)	95,9% - 100,0%
Gesamtübereinstimmung	330/330 (100,0%)			330/330 (100,0%)			330/330 (100,0%)			990/990 (100.0%)	99,6% – 100,0%

ANALYSEEMPFINDLICHKEIT / NACHWEISGRENZE

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LoD) des Simplexa™ Flu A/B & RSV-Assays wurde mit quantifizierten Proben von Influenza A-, Influenza B- und RSV-Virusstämmen in Verdünnungsreihen in einer negativen Abstrichmatrix ermittelt. Bei jedem Stamm wurde die Extraktion sowohl mit dem Roche MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit als auch mit NucliSENS® easyMAG™ von bioMérieux durchgeführt. Als Nachweisgrenze für jeden Assay wurde die niedrigste Konzentration mit einer Erkennung von ≥95 % (mindestens 19 von 20 Replikaten) festgelegt.

Simplexa™ Flu A/B & RSV-Nachweisgrenze

Virusstamm	LoD MagNA Pure-Extraktion ($TCID_{50}$/ml)	LoD NucliSENS easyMAG-Extraktion ($TCID_{50}$/ml)
Influenza A/PR/8/34 (H1N1)	$1{,}0 \times 10^{-2}$	$1{,}0 \times 10^{-2}$
Influenza A/Hong Kong/8/68 (H3N2)	$1{,}0 \times 10^{1}$	$1{,}0 \times 10^{1}$
Influenza B/Great Lakes/1739/54	$1{,}0 \times 10^{0}$	$5{,}0 \times 10^{0}$
Influenza B/Malaysia/2506/2004	$1{,}0 \times 10^{1}$	$1{,}0 \times 10^{1}$
RSV A2	$1{,}0 \times 10^{0}$	$1{,}0 \times 10^{0}$
RSV B1	$1{,}0 \times 10^{0}$	$5{,}0 \times 10^{0}$

ANALYTISCHE REAKTIVITÄT / KREUZREAKTIVITÄT

Analytische Reaktivität

Es wurden verschiedene Stämme von Influenza A, einschließlich der Subtypen H1 und H3, von Influenza B und von RSV, einschließlich der Subtypen A und B, untersucht. Gewählt wurden die Stämme, die jüngst im Umlauf waren, sowie geografisch unterschiedliche Stämme. Von quantifiziertem Virusmaterial wurde in einer negativen Abstrichmatrix eine einzige Verdünnung in der Nähe der Nachweisgrenze mit einer Konzentration von etwa $1{,}0 \times 10^{2}$ $TCID_{50}$/ml hergestellt und in dreifacher Ausführung getestet.

Analytische Reaktivität mit zusätzlichen Virusstämmen

Virusstamm	Geringste detektierte Konzentration $TCID_{50}$/ml	Ergebnis
Influenza A/Wisconsin/67/05 H3	$1{,}0 \times 10^{2}$	Flu A detektiert
Influenza A/New Caledonia/10/07 H1N1	$1{,}0 \times 10^{2}$	Flu A detektiert
Influenza A/Brisbane/10/07 H3	$1{,}0 \times 10^{2}$	Flu A detektiert
Influenza A/Solomon Island/03/06 H1	$1{,}0 \times 10^{2}$	Flu A detektiert
Influenza A/Taiwan/42/06 H1N1	$1{,}0 \times 10^{2}$	Flu A detektiert
Influenza A/Brisbane/59/07 H1	$1{,}0 \times 10^{2}$	Flu A detektiert
Influenza A/Swine NY/02/2009 H1	$1{,}0 \times 10^{2}$	Flu A detektiert
Influenza A/WS/33 H1N1	$1{,}0 \times 10^{2}$	Flu A detektiert
Influenza A/Port Chalmers/1/73 H3N2	$1{,}0 \times 10^{2}$	Flu A detektiert
Influenza A/California/7/2009 NYMC X-179A	$1{,}0 \times 10^{2}$	Flu A detektiert
Influenza B/Florida/02/06	$1{,}0 \times 10^{2}$	Flu B detektiert
Influenza B/Florida/04/06	$2{,}0 \times 10^{2}$	Flu B detektiert
Influenza B/Florida/07/04	$1{,}0 \times 10^{2}$	Flu B detektiert
Influenza B/Lee/40	$1{,}0 \times 10^{2}$	Flu B detektiert
Influenza B/Maryland/1/59	$1{,}0 \times 10^{2}$	Flu B detektiert
Influenza B/Hong Kong/5/72	$1{,}0 \times 10^{2}$	Flu B detektiert
Influenza B/Allen/45	$1{,}0 \times 10^{2}$	Flu B detektiert
Influenza B/Taiwan/2/62	$2{,}0 \times 10^{2}$	Flu B detektiert
Influenza B/Panama/45/90	$2{,}0 \times 10^{2}$	Flu B detektiert
RSV A-Long	$1{,}0 \times 10^{2}$	RSV detektiert
RSV B-Wash/18537/62	$1{,}0 \times 10^{2}$	RSV detektiert
RSV B-WV/14617/85	$1{,}0 \times 10^{2}$	RSV detektiert
RSV B-9320	$1{,}0 \times 10^{2}$	RSV detektiert

Kreuzreaktivität (analytische Spezifität)

Die analytische Spezifität des Simplexa™ Tests wurde untersucht, indem getestet wurde, ob ausschließlich Influenza A-Virus und/oder Influenza B-Virus und/oder RSV identifiziert werden, ohne Kreuzreaktivität auf nah verwandte Keime oder Keime, die die gleichen klinischen Symptome verursachen oder Keime, die als normale Flora in den zu untersuchenden Proben vorkommen.

Eine Serie von zweiunddreißig (32) möglichen Kreuzreagenzien wurde einzeln in klinisch relevanten Konzentrationen in eine Abstrichmatrix geimpft. Die unbeimpfte Matrix wurde ebenfalls getestet, um Ausgangswerte zu erhalten. Die Proben wurden dreifach getestet, um Kreuzreaktivität zu erkennen. Falls in einem der Detektionskanäle (Flu A, Flu B, RSV) in einem der drei Replikate ein Signal detektiert wurde, wurden weitere 5 Replikate zur Bestätigung getestet.

Weder für Flu A, noch für Flu B oder RSV wurde Kreuzreaktivität festgestellt.

Simplexa Flu A/B & RSV – Kreuzreaktivität

Kreuzreagenz	Testkonzentration	Einheiten	Flu A	Flu B	RSV
Adenovirus 1	1,02 x10^5	$TCID_{50}$/ml	–	–	–
Adenovirus 7A	4,57 x10^5	$TCID_{50}$/ml	–	–	–
Bordetella pertussis	5,80 x10^5	KBE/ml	–	–	–
Chlamydia pneumoniae	1,52 x10^5	IFU/ml	–	–	–
Coronavirus 229E	2,45 x10^5	$TCID_{50}$/ml	–	–	–
Coronavirus OC43	1,70 x10^5	$TCID_{50}$/ml	–	–	
Corynebacterium diphtheriae	2,87 x10^6	KBE/ml	–	–	–
Cytomegalievirus	3,55 x10^5	$TCID_{50}$/ml	–	–	–
Enterovirus 71	1,41 x10^5	$TCID_{50}$/ml	–	–	–
Epstein-Barr-Virus	6,04 x10^5	Kopien/ml[1]	–	–	–
Escherichia coli, O157H7	2,34 x10^6	KBE/ml	–	–	–
Haemophilus influenzae	2,60 x10^6	KBE/ml	–	–	–
Lactobacillus plantarum, 17-5	1,75 x10^6	KBE/ml	–	–	–
Legionella longbeachae	7,10 x10^6	KBE/ml	–	–	–
Masern	1,26 x10^5	$TCID_{50}$/ml	–	–	–
Metapneumovirus	5,01 x10^5	$TCID_{50}$/ml	–	–	–
Moraxella catarrhalis, Ne 11	6,83 x10^6	KBE/ml	–	–	–
Mumps	8,51 x10^5	$TCID_{50}$/ml	–	–	–
Mycobacterium tuberculosis	2,20 x10^6	KBE/ml	–	–	–
Mycoplasma pneumoniae, Stamm M129	5,63 x10^6	$TCID_{50}$/ml	–	–	–
Neisseria elongata	1,99 x10^6	KBE/ml	–	–	–
Neisseria meningitidis	1,63 x10^6	KBE/ml	–	–	–
Parainfluenza 1	6,61 x10^5	$TCID_{50}$/ml	–	–	–
Parainfluenza 2	5,89 x10^5	$TCID_{50}$/ml	–	–	–
Parainfluenza 3	6,61 x10^5	$TCID_{50}$/ml	–	–	–
Pseudomonas aeruginosa	1,05 x10^6	KBE/ml	–	–	–
Rhinovirus 1A	3,16 x10^5	$TCID_{50}$/ml	–	–	–
Staphylococcus aureus, COL	8,40 x10^6	KBE/ml	–	–	–
Staphylococcus epidermidis	3,80 x10^6	KBE/ml	–	–	–
Streptococcus pneumoniae	5,54 x10^6	KBE/ml	–	–	–
Streptococcus pyogenes	1,55 x10^6	KBE/ml	–	–	–
Streptococcus salivarius	1,14 x10^6	KBE/ml	–	–	–

1) Das EBV-Virus wird auf einer transformierten Zelllinie (Marmoset-Leukozyten) vermehrt. Transformierte Zellen eignen sich als Zelllinie nicht für die Quantifizierung mit $TCID_{50}$/ml, deshalb wurden mit einem quantitativen PCR-Verfahren Kopien/ml berechnet.

INTERFERENZ

Die Leistung dieses Assays wurde mit möglicherweise interferierenden und in Nasenrachenabstrichen ggf. vorhandenen Substanzen in den in der nachstehenden Tabelle angegebenen Konzentrationen getestet. **Die möglicherweise interferierenden Substanzen wurden mit** Influenza A (Influenza A/Hong Kong/8/68) und Influenza B (Influenza B/Malaysia/2506/2004) in einer Konzentration von 50 $TCID_{50}$/ml und mit RSV A2 in einer Konzentration von 5 $TCID_{50}$/ml **untersucht.** Es ergaben sich keine Hinweise auf eine Interferenz aufgrund der getesteten Substanzen.

Potenziell interferierende Substanz	Wirkstoff	Konzentration der Interferierenden Substanz
Afrin (Nasenspray)	Oxymetazolin	15 % (Vol./Vol.)
Virostatikum Relenza	Zanamivir	3,3 mg/ml
Virostatikum Tamiflu	Oseltamivir	25 mg/ml
Antibiotikum, systemisch	Tobramycin	4,0 µg/ml
Antibiotikum, Nasensalbe	Mupirocin	6,6 mg/ml

Potenziell interferierende Substanz	Wirkstoff	Konzentration der Interferierenden Substanz
Blut	n. z.	2 % (Vol./Vol.)
Bovines submaxillares Muzin, Typ I-S	Gereinigtes Muzin-Protein	60 µg/ml
Nasen-Corticosteroid Beconase AQ	Beclomethason	5 % (Vol./Vol.)
Nasen-Corticosteroid Fluticason	Fluticason	5 % (Vol./Vol.)
Zicam Nasengel	Luffa Opperculata, Galphimia glauca, histaminum hydrochloricum	5 % (Vol./Vol.)

KOMPETITIVE INTERFERENZEN

Die Studie der kompetitiven Interferenz untersuchte die Auswirkungen klinisch relevanter Begleitinfektionen bei jedem der vom Assay nachgewiesenen Analyten. Es wurde geprüft, ob eine hohe Konzentration eines Virus in der Probe die Leistung des Simplexa-Assays hinsichtlich eines anderen, niedrig konzentrierten Targets im Multiplex-Assay möglicherweise beeinflussen könnte. Es wurde für jedes Target (Influenza A, Influenza B und RSV) eine schwach konzentrierte Probe (etwa das 4- bis 6-Fache der Nachweisgrenze) zubereitet und für jede Probe ein Ct-Baselinewert ermittelt. Die schwach konzentrierte Probe wurde mit einer hohen Konzentration eines jeden möglicherweise bei einer Begleitinfektion vorhandenen Virus beimpft (siehe nachstehende Tabelle).

Baseline-Stamm (Konzentration)	Kompetitiver Stamm (Konzentration)
Influenza A/PR/8/34 ($8{,}80 \times 10^1$ $TCID_{50}$/ml)	RSV A2 ($1{,}60 \times 10^4$ $TCID_{50}$/ml)
Influenza B/Malaysia/2506/2004 ($1{,}29 \times 10^2$ $TCID_{50}$/ml)	RSV A2 ($1{,}60 \times 10^4$ $TCID_{50}$/ml)
RSV A2 (<10 $TCID_{50}$/ml)	Influenza A/PR/8/34 ($2{,}50 \times 10^5$ $TCID_{50}$/ml)*
	Influenza B/Malaysia/2506/2004 ($2{,}58 \times 10^5$ $TCID_{50}$/ml)

* In dem seltenen Fall, wenn sehr hohe Konzentrationen von Influenza A, aber niedrige Konzentrationen von RSV vorhanden sind, ist das Signal der RSV-Reaktion aufgrund einer kompetitiven Interferenz unter Umständen nicht stark genug, um detektiert zu werden. Es ist zu beachten, dass keine Hinweise auf eine kompetitive Interferenz bei Vorhandensein aller drei Viren in moderaten Konzentrationen (wie in unserer Positivkontrolle) vorliegen.

HEMMUNG DURCH ANDERE MIKROORGANISMEN

Der Simplexa™-Assay wurde auf seine Fähigkeit zur Erkennung von Influenza A-Virus, Influenza B-Virus und RSV im Beisein potenziell inhibitorischer Organismen untersucht.

Das Panel von zweiunddreißig (32) potenziellen inhibitorischen Organismen wurde einzeln in einen Pool mit niedriger Konzentration (etwa doppelte Nachweisgrenze) von Influenza A (Influenza A/PR/8/34), Influenza B (Influenza B/Malaysia/2506/2004) und RSV (A2) geimpft. Die Proben wurden dreifach getestet, um eine Hemmung zu erkennen. Falls in einem der Detektionskanäle (Flu A, Flu B, RSV) in einem der drei Replikate kein Signal detektiert wurde, wurden weitere 5 Replikate zur Bestätigung getestet.

Weder für Influenza A noch für Influenza B oder RSV wurde eine hemmende Wirkung festgestellt.

Mikroorganismus	Konzentration des Mikroorganismus	Konzentrationseinheiten	Flu A	Flu B	RSV
Adenovirus 1	$1{,}1 \times 10^5$	$TCID_{50}$/ml	+	+	+
Adenovirus 7A	$1{,}1 \times 10^5$	$TCID_{50}$/ml	+	+	+
Bordetella pertussis	$1{,}1 \times 10^6$	KBE/ml	+	+	+
Chlamydia pneumoniae	$1{,}1 \times 10^6$	Kopien/ml	+	+	+
CMV	$1{,}1 \times 10^5$	$TCID_{50}$/ml	+	+	+
Coronavirus 229E	$1{,}1 \times 10^5$	$TCID_{50}$/ml	+	+	+
Coronavirus OC43[1]	$1{,}1 \times 10^5$	$TCID_{50}$/ml	+	+	+
Corynebacterium diphtheriae	$1{,}1 \times 10^6$	KBE/ml	+	+	+
E. coli O157	$1{,}1 \times 10^6$	KBE/ml	+	+	+
EBV	$1{,}1 \times 10^5$	Kopien/ml	+	+	+
Enterovirus 71	$1{,}1 \times 10^5$	$TCID_{50}$/ml	+	+	+

Mikroorganismus	Konzentration des Mikroorganismus	Konzentrationseinheiten	Flu A	Flu B	RSV
Haemophilus influenzae	$1{,}1 \times 10^6$	KBE/ml	+	+	+
Lactobacillus plantarum, 17-5	$1{,}1 \times 10^6$	KBE/ml	+	+	+
Legionella longbeachae	$1{,}1 \times 10^6$	KBE/ml	+	+	+
Masern	$1{,}1 \times 10^5$	$TCID_{50}$/ml	+	+	+
Metapneumovirus[1]	$1{,}1 \times 10^5$	$TCID_{50}$/ml	+	+	+
Moraxella catarrhalis Ne11	$1{,}1 \times 10^6$	KBE/ml	+	+	+
Mumps	$1{,}1 \times 10^5$	$TCID_{50}$/ml	+	+	+
Mycobacterium tuberculosis	$1{,}1 \times 10^6$	KBE/ml	+	+	+
Mycoplasma pneumoniae M129	$1{,}1 \times 10^6$	$TCID_{50}$/ml	+	+	+
Neisseria elongata	$1{,}1 \times 10^6$	KBE/ml	+	+	+
Neisseria meningitidis	$1{,}1 \times 10^6$	KBE/ml	+	+	+
Parainfluenza 1	$1{,}1 \times 10^5$	$TCID_{50}$/ml	+	+	+
Parainfluenza 2	$1{,}1 \times 10^5$	$TCID_{50}$/ml	+	+	+
Parainfluenza 3	$1{,}1 \times 10^5$	$TCID_{50}$/ml	+	+	+
Pseudomonas aeruginosa	$1{,}1 \times 10^6$	KBE/ml	+	+	+
Rhinovirus 1A	$1{,}1 \times 10^5$	$TCID_{50}$/ml	+	+	+
Staphylococcus aureus, COL	$1{,}1 \times 10^6$	KBE/ml	+	+	+
Staphylococcus epidermidis	$1{,}1 \times 10^6$	KBE/ml	+	+	+
Streptococcus pneumoniae	$1{,}1 \times 10^6$	KBE/ml	+	+	+
Streptococcus pyogenes	$1{,}1 \times 10^6$	KBE/ml	+	+	+
Streptococcus salivarius	$1{,}1 \times 10^6$	KBE/ml	+	+	+

1) Der Test schien anfangs auf eine mögliche Hemmung hinzudeuten, was sich bei Testwiederholung nicht bestätigte.

KONTAMINATION DURCH VERSCHLEPPUNG

Die Studie auf Amplifikation von Verschleppungen zielte darauf ab, Kontaminationen in hoch negativen Proben festzustellen. Die Studie bestand daraus, eine hoch positive und eine hoch negative Probe abwechselnd auf jeder Disc zu platzieren. Der Verschleppungseffekt wurde durch Vergleich der beobachteten Negativrate für die hoch negative Probe mit der erwarteten Rate unter normalen Bedingungen der Testwiederholung bestimmt. Weder für Flu A, noch für Flu B oder RSV wurde eine Kontamination durch Verschleppung festgestellt.

ERWARTETE WERTE

Die Prävalenz der Influenza ändert sich jedes Jahr; eine Grippesaison tritt in den USA im Herbst und Winter auf. Zu den Variablen, die die Anzahl der positiven Fälle aus Atemwegsproben beeinflussen gehören: die Effizienz und die Auswahl des Zeitpunktes der Probenentnahme, die Handhabung und der Transport der Proben, die Jahreszeit, das Alter der Patienten und die lokale Krankheitsprävalenz. Die prospektiven Proben, die wir in unserer klinischen Studie verwendeten, stammten aus den USA und aus Australien. Die Prävalenz aller Influenzaviren in den USA[2] während des Zeitraums der Probensammlung von Februar bis März 2010 lag im Bereich von 3,5 bis 6,4 %. Von den Influenza-Positiven waren 97 bis 99,6 % für Influenza A und 0 bis 1,5 % für Influenza B positiv. In jedem Herbst, Winter und/oder in den Frühlingsmonaten treten RSV-Epidemien auf, die in der Regel 3–4 Monate anhalten. Wann genau die RSV-Epidemien jeweils auftreten, kann je nach Region verschieden sein[3]. Die Prävalenz von RSV in den USA während des Zeitraums der Probensammlung von Februar bis März 2010 lag im Bereich von 5 bis 12 %[4].

Die im Rahmen unserer klinischen Studie festgestellte Prävalenz ist in der nachstehenden Tabelle angegeben.

Region	Flu A	Flu B	RSV
Texas	10,2%	0%	18,0%
Ohio	0%	1,0%	49,0%
Australien	1,6%	0,4%	5,6%

LITERATUR

1. http://www.cdc.gov/rsv/clinical/description.html
2. http://www.cdc.gov/Flu/weekly/Fluactivity.htm
3. http://www.cdc.gov/Features/dsRSV/
4. http://www.cdc.gov/surveillance/nrevss/rsv/state.html

Die Anwendung von Scorpions® Sonden für Zwecke in Zusammenhang mit der *In-vitro*-Diagnostik beim Menschen ist durch eine Lizenz geschützt, die Focus Diagnostics, Inc. von DxS, Ltd. erworben hat.
Die Farbstoffe Black Hole Quencher™, CAL Fluor™ und Quasar™ sind Handelsmarken der Biosearch Technologies, Inc. ('BTI'). Die Black Hole Quencher, CAL Fluor- und Quasar-Farbstofftechnologie ist im Rahmen eines Vertrags mit BTI lizenziert, und diese Produkte werden ausschließlich für klinische, diagnostische oder Forschungs- und Entwicklungszwecke verkauft.

VERTRIEB DURCH:
mdi Europa GmbH, Langenhagener Str. 71 30855, Langenhagen-Hannover, Deutschland

BESTELLINFORMATION
Telefon: **(800) 838-4548 (nur USA)** **(562) 240-6500 (international)**
Fax: **(562) 240-6510**

TECHNISCHE HILFE

Telefon: (800) 838-4548 (nur USA) (562) 240-6500 (international)
Fax: (652) 240-6526

Besuchen Sie unsere Webseite: www.focusdx.com

CE
PI.MOL2600 .IVD
Rev. D
Erstellungsdatum: 16. Juni 2011

Cypress, Kalifornien 90630 USA